

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Кострюковой Любови Викторовны «ФОСФОЛИПИДНАЯ НАНОСИСТЕМА НАПРАВЛЕННОГО ТРАНСПОРТА ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ХЛОРИНА Е6 К ОПУХОЛЕВЫМ КЛЕТКАМ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия

Актуальность темы диссертационного исследования.

Фотодинамическая терапия, как один из методов лечения злокачественных опухолей, основана на введении в организм специальных веществ – фотосенсибилизаторов (ФС), способных накапливаться в опухолевой ткани, с последующим локальным световым облучением очага поражения. Активация ФС световым воздействием приводит к образованию активных форм кислорода и свободных радикалов, обладающих высоким цитотоксическим и цитостатическим потенциалом. Однако, несмотря на перспективность данного вида химиотерапии, ФДТ не лишена ряда существенных недостатков, таких как плохая растворимость, развитие побочных эффектов за счет поглощения ФС здоровыми тканями.

Использование липосом для транспорта и направленной доставки ФС является одним из перспективных направлений ФДТ. Липосомы могут быть использованы для солюбилизации гидрофобных ФС, что обеспечивает возможность их доклинического и клинического применения. Более того, исследования показывают, что инкапсуляция гидрофобных фотосенсибилизаторов в липосомы не только облегчает их введение *in vivo*, но и приводит к повышению биодоступности ФС для опухолевых тканей, изменению биораспределения таких препаратов. Использование для повышения избирательности векторных пептидов многократно повышает противоопухолевую эффективность липосом и минимизирует побочные эффекты.

Таким образом, диссертационное исследование Любови Викторовны Кострюковой, посвященное разработке, исследованию свойств и исследованию эффективности липосомальной формы ФС хлорина е6, безусловно является актуальным и востребованным.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность.

Основные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе Кострюковой Л.В. научно обоснованы, закономерно следуют из результатов, базируются на достаточном экспериментальном материале. Работа выполнена на прекрасном методическом уровне с использованием современных высокоточных аналитических методов, достоверность результатов благодаря использованному арсеналу методов, соблюдению требований статистики при проведении экспериментов не вызывает сомнений. Статистическая обработка результатов проведена корректно и позволяет в полной мере обосновать выводы диссертации и положения, выносимые на защиту.

Научная новизна исследования, теоретическая и практическая значимость полученных результатов.

Впервые получены и детально охарактеризованы по физико-химическим свойствам, биологической активности *in vitro* ультрамалые фосфолипидные липосомы с включенным в них Себ; исследовано их накопление в опухолевой и нормальной тканях животных. Выявлена возможность повышения накопления хлорина в опухоли при внутривенном введении животным липосом с инкапсулированным Себ и ускоренного выведения из здоровых органов. Впервые получены три фосфолипидные композиции Себ в фосфолипидных липосомах с включенными в их состав таргетным пептидом и проникающим в клетку пептидом, изучено связывание и интернализация таргетных липосом опухолевыми клетками, и их цитотокическое действие.

Полученные в результате диссертационного исследования результаты не только расширяют представления о свойствах липосом сверхмалого размера, нагруженных фотосенсибилизатором Себ, и модифицированных таргетным и проникающим пептидами, но и представляют существенную практическую значимость. Результаты диссертационного исследования стали предметом трех патентов Российской Федерации. Метод получения липосом является технологичным, что повышает вероятность заинтересованности производителей противоопухолевых лекарственных средств в данном противоопухолевом препарате, конечно, при успешном проведении доклинических испытаний.

Полнота изложения основных результатов диссертации в рецензируемых научных изданиях.

Основные результаты диссертации отражены в 17 публикациях в журналах и сборниках конференций, из них 3 статьи в рецензируемых научных журналах,

включенных в Перечень ВАК РФ, в 3 журналах, индексированных в базах данных Web of Science и Scopus. Кострюкова Л.В. является автором трех патентов, оформленных с использованием результатов диссертационного исследования.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа Л.В. Кострюковой построена по классическому принципу и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, описание результатов исследования и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, содержащий 239 источников. Диссертация изложена на 118 страницах печатного текста, иллюстрирована 25 рисунками и содержит 8 таблиц и 3 приложения.

Введение посвящено обоснованию актуальности исследования, изложены цель и задачи работы, новизна и практическая значимость. Задачи соответствуют поставленной цели, положения, выносимые на защиту, сформулированы корректно.

Обзор литературы представлен тремя разделами. В первом разделе автор рассматривает основные принципы ФДТ, описывает принцип активации химических соединений-фотосенсибилизаторов, вызываемые биологические эффекты, подробно характеризует различные ФС, их применение в химиотерапии опухолей, достоинства и недостатки. В результате анализа Л.В. Кострюкова выделяет основные требования к "идеальному" фотосенсибилизатору. Второй раздел посвящен описанию и анализу различных систем доставки ФС: конъюгатов с белками, полимерных наночастиц, липосом, таргетных наночастиц. В третьем разделе автор детально анализирует возможность использования для направленной доставки пептидов, как "адресных", то есть, связывающихся с рецепторами или другими белками на поверхности опухолевой клетки, так и так называемых "проникающих".

Обзор литературы охватывает современные сведения по изучаемым вопросам, вводит читателя в круг анализируемых автором проблем. Обзор написан хорошим литературным языком, четко структурирован, читается с большим интересом.

В главе «Материалы и методы» очень подробно и наглядно описаны все использованные автором материалы и весь арсенал использованных в работе методов. Все использованные методы полностью адекватны поставленным задачам.

Собственные результаты автора и их обсуждение изложены в соответствующей главе. Л.В. Кострюковой были получены липосомы малого размера с инкапсулированным хлорином e6, детально охарактеризованы с использованием физико-химических методов. В экспериментах *in vitro* автор доказал, что включение

Себ в липосомы не только не влияет на свойства хлорина, но приводит к значительному повышению цитотоксической фотодинамической активности Себ. При этом "темновая" токсичность липосом не превышала таковую свободного Себ. В экспериментах *in vivo*, при внутривенном введении липосом, нагруженных хлорином еб, мышам с опухолью LLC наблюдалось высокое накопление Себ в опухолевой ткани, по сравнению с накоплением в коже и мышцах. Выведение Себ, инкапсулированного в липосомы, из крови происходило быстрее, по сравнению со свободным хлорином еб. Липосомный препарат также быстрее выводился печенью и почками.

Л.В. Кострюковой были получены липосомы, содержащие биологически-активные пептиды: векторный пептид NGR, проникающий пептид R7, а также липосомы, содержащие оба указанных пептида. Обнаружено, что липосомы с векторным пептидом NGR, эффективнее проникали в опухолевые клетки, экспрессирующие антиген CD13, в то время как в клетках линии MCF7, не экспрессирующие аминопептидазу, накопление Себ оставалось на уровне липосом без пептидов. Фотоиндуцированная цитотоксическая активность таргетных липосом существенно превышала активность липосом без NGR-пептида.

Проникающий пептид R7 выборочно влиял на накопление хлорина в клетках (отсутствие увеличения по сравнению с липосомами без пептида в клетках линии HepG2 и повышение связывания и накопления в клетках линии HT-1080), но повышал фотоиндуцированную цитотоксическую активность липосом с инкапсулированным Себ для всех трех линий опухолевых клеток. Выбранный таргетный пептид повышал internalизацию липосом в клетках HT-1080 и HepG2 по сравнению с internalизацией липосом без вектора, но не влиял на развитие фотоиндуцированной цитотоксичности. Включение в липосомы сразу двух пептидов приводило к более эффективной internalизации липосом с хлорином еб в клетках, экспрессирующих CD13, однако не усиливало цитотоксичность по сравнению с липосомами, несущими только проникающий пептид.

В «Заключении» автор подводит итоги исследования, обобщая полученные результаты. Все 6 выводов диссертационной работы логично вытекают из полученных данных, адекватны и полностью обоснованы.

**Соответствие содержания автореферата основным положениям
диссертации.**

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями, предъявляемыми к авторефератам, дает полное представление об основных положениях диссертации и соответствует ее содержанию.

Замечания по содержанию и оформлению диссертационной работы.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе Л.В. Кострюковой нет.

Вопросы и замечания не принципиального характера:

1. Было бы неплохо в качестве отрицательного контроля использовать также неопухолевые клетки (лимфоциты, фибробласты, эпителий) для доказательства избирательности липосомальных систем доставки.
2. На чем основана применяемая в экспериментах с клетками продолжительность «темновой» фазы, то есть время инкубации после добавления клеткам препаратов и до их облучения? С моей точки зрения, 4 ч и 24 ч – слишком длительный период. Возможно, при снижении продолжительности «темновой» фазы до 1-2 часов проявился бы эффект таргетного пептида NGR.

Следует подчеркнуть, что замечания носят лишь частный характер и ни в коем случае не снижают ценность полученных результатов и не ставят под сомнение научную значимость исследования.

Заключение

Диссертационная работа Кострюковой Любови Викторовны на тему: «Фосфолипидная наносистема направленного транспорта фотосенсибилизатора хлорина к опухолевым клеткам», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия, является самостоятельной цельной законченной, научно-квалификационной работой, результаты и выводы которой вносят существенный вклад в развитие современной биохимии, а именно в исследование свойств фотосенсибилизаторов и разработку систем их направленной доставки. По своей актуальности, научной новизне, содержанию, объему и уровню проведенных исследований, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности полученных результатов, научной и практической значимости, диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в действующей редакции от 20 марта 2021 г. № 426), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой

степени кандидата биологических наук, а ее автор, Кострюкова Любовь Викторовна, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Официальный оппонент:
ведущий научный сотрудник лаборатории
клеточной биологии и молекулярной медицины
Федерального государственного бюджетного
учреждения «Национальный исследовательский
центр «Курчатовский институт», доктор
биологических наук по специальности 1.5.4 –
биохимия (ранее 03.01.04)

Почтовый адрес: 123182, Российская Федерация, г.

Москва, площадь Академика Курчатова, 1.

Телефон: +7(499)196-7100, доб. 6683

Электронная почта: galinapo@gmail.com

10

Посыпанова Г.А.

«22» 10 2021 г.

Подпись д.б.н. Посыпановой Галины Ароновны заверяю.

Главный ученый секретарь
«Курчатовский институт»



И.И. Еремин